

the aforementioned 4 factors was analyzed. We divided the patients into two groups: the patients with at least one of these four factors, and the others without these factors (Table 3). Of these 11 combinations, the 4 groups without 'male infertility', indicating the 4 groups with only female factors, showed approximately 1% CPR per cycle, whereas CPR improved as the number of excluded factors increased. For example, 95 patients without these 4 factors showed 9.14% CPR per cycle.

## Discussion

Associated with a trend to postpone childbearing and first birth in developed countries [2], there is an increase in visits to the infertility clinic for aged women who have an intrinsic decrease in fertility with advancing age. Although a woman will not reach menopause until about 50 years of age, her effective childbearing period may stop almost a decade earlier; however, they should be candidates for an expedited infertility work-up. In order to maximize the chance of pregnancy, some aged women are possibly obliged to choose IVF/ICSI or to abandon their entire treatment because of the extremely poor prognosis for conception [3, 7, 8], while others can expect relatively good prognosis. The optimization of treatment protocols for infertility in advanced reproductive age women is crucial and fertility centers should develop evidence-based policies to guide decisions about treating couples with very poor prognoses [10]. Previously, many literatures reported prediction models using various parameters such as female age, duration of infertility, male factor, unilateral tubal obstruction, cervical factors, endometriosis, uterine anomalies, and increasing number of cycles. Female age is one of the most important factors among these determinants [5, 6, 8]. Our data focused only on advanced age women who underwent non-IVF/ICSI treatment. 95 patients who had none of the following 4 factors, 'advanced female age', 'endometriosis/adenomyosis', 'tubal infertility', and 'male infertility' achieved relatively good CPR, 9.14% per cycle and 37.9% per patient in our study. Although our study was retrospective and our sample size was limited, our data clearly indicate that clinicians could distinguish between poor and good prognostic infertile women easily by considering the combination of poor prognostic factors. For instance, 41.7% (155/372) of patients who had one of the three factors, 'advanced female age', 'endometriosis/adenomyosis', or 'tubal infertility', had difficulty conceiving by non-IVF/ICSI treatment in our study population because CPR was only 3.23% per patient, while the others could

expect over 20–30% CPR per patient (Table 3). This result indicates the efficacy of non-IVF/ICSI treatment for selected advanced age women, and gynecologists should take the patient's background into account prior to commencing therapy [3, 7, 10].

In conclusion, extraction of poor prognostic factors and consideration of their combinations can provide appropriate protocols for advanced reproductive age patients.

**Acknowledgments** This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture and Kanzawa Medical Research Foundation, Japan.

## References

1. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*. 1991;337:1375–7.
2. Ziebe S, Devroey P. Assisted reproductive technologies are an integrated part of national strategies addressing demographic and reproductive challenges. *Hum Reprod Update*. 2008;14:583–92.
3. Tsafirir A, Simon A, Margalioth EJ, Laufer N. What should be the first-line treatment for unexplained infertility in women over 40 years of age—ovulation induction and IUI, or IVF? *Reprod Biomed Online*. 2009;19(Suppl 4):4334.
4. Brandes M, van der Steen JO, Bokdam SB, Hamilton CJ, de Bruin JP, Nelen WL, Kremer JA. When and why do subfertile couples discontinue their fertility care? A longitudinal cohort study in a secondary care subfertility population. *Hum Reprod*. 2009;24:3127–35.
5. Dovey S, Sneeringer RM, Penzias AS. Clomiphene citrate and intrauterine insemination: analysis of more than 4100 cycles. *Fertil Steril*. 2008;90:2281–6.
6. Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, Hughes EG, Fauser BC. Patient predictors for outcome of gonadotrophin ovulation induction in women with normogonadotrophic anovulatory infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2003;9:429–49.
7. Haebe J, Martin J, Tekepety F, Tummon I, Shepherd K. Success of intrauterine insemination in women aged 40–42 years. *Fertil Steril*. 2002;78:29–33.
8. Custers IM, Steures P, van der Steeg JW, van Dessel TJ, Bernardus RE, Bourdrez P, Koks CA, Riedijk WJ, Burggraaff JM, van der Veen F, Mol BW. External validation of a prediction model for an ongoing pregnancy after intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2007;88:425–31.
9. Malizia BA, Hacker MR, Penzias AS. Cumulative live-birth rates after in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2009;360:236–43.
10. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility treatment when the prognosis is very poor or futile. *Fertil Steril*. 2009;92:1194–7.
11. Yarali H, Bozdag G, Polat M, Esinler I, Tiras B. Intracytoplasmic sperm injection outcome of women over 39: an analysis of 668 cycles. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281:349–54.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

## 特集

## 専門家に聞く子宮筋腫 Q &amp; A—子宮温存を目指して

## 5. 子宮筋腫合併不妊を妊娠に導くには

藤本 晃久

東京大学医学部附属病院女性診療科・産科

### 要旨

子宮筋腫合併不妊症例に対し、治療方針を決定する上で重要な検討事項として、①子宮筋腫が本当に不妊の原因となっているか、②子宮筋腫を核出することにより、どの程度の妊孕性改善が見込まれるか(特に患者の年齢、卵巢予備能を考慮)、③不妊治療を優先した場合、また筋腫に対する手術を優先した場合の各々の利点、欠点について、十分な説明を受け、患者が納得しているか、が挙げられる。なお、筋腫が不妊の原因かどうかの判断が難しい場合、特に高年齢の不妊症例に対しては、積極的にARTを行い、筋腫が着床障害の原因となっているかを確認し、できれば凍結胚を確保した上で手術に踏み切る。あるいは、手術のための時間のロスを見越して、最初から採卵、良好胚の全凍結を行い、手術を行う方法もある。

**KeyWords** Myomectomy, infertility, ART

### はじめに

近年の晩婚化、晩産化に伴い、不妊外来を高年齢(35歳以上、特に40歳以上)の患者が受診することは、日常しばしば見受けられるようになった。またこれらの年齢層は子宮筋腫の好発年齢とも重なることから、初診時に子宮筋腫を認め、手術と不妊治療のどちらを優先させるか、対応に苦慮することも多い。ここでは、子宮筋腫合併不妊症例を妊娠に導くために、考慮すべき点について述べたい。

### 子宮筋腫が不妊の原因となるか

子宮筋腫の手術と不妊治療のどちらを優先させるかを定める最も大きな要素は、子宮筋腫が

不妊原因となっているかどうかである。一般に、粘膜下筋腫や、内腔変形を伴う筋層内筋腫が着床障害の原因となっていることはエビデンスが得られている<sup>1)</sup>が、漿膜下筋腫や内腔変形を伴わない筋層内筋腫が不妊の原因となるかどうかについては議論の余地がある。Oliveiraらは、こうした筋腫を有する245名の症例に対し生殖補助医療(ART)を行い、位置、数にかかわらず4cm以上の筋腫を有する症例では対照群に比較して妊娠率が低下した、と報告している<sup>2)</sup>。また、Prittsらのメタ解析によれば、筋層内筋腫では妊孕性が低下し、流産率が増加する傾向にあったが有意差はなく、また筋腫核出術がこれらを改善するか否かについてもエビデンスは得られなかったとしている。また、漿膜下筋腫は妊孕性には影響しないが流産率が増えたと報告している<sup>1)</sup>。

また、妊娠成立の有無のみならず、妊娠継続～出産に至るまでのプロセスに筋腫が影響するか否かについても検討が必要である。Oliveらは、子宮筋腫が妊娠に与える影響として、帝王切開率の上昇、胎位異常、産褥出血、胎盤遺残、子宮内胎児発育遅延、早産、前置胎盤、胎盤早期剥離を挙げている<sup>3)</sup>。なお、Yoshinoらは、*cine-mode-display MRI*を不妊治療前に行うことにより、子宮筋腫により妊孕性が低下する症例を抽出しえた、としており<sup>4)</sup>、今後の検討が注目される。

いずれにしろ、子宮筋腫が不妊の原因となっているか否かをみるためには、超音波検査、子宮鏡、MRIを行い、子宮内腔に対する影響を調べる。筋腫が不妊の原因と考えられる場合は、手術療法を優先し、筋腫の位置、大きさ、数に応じて、また施設の設備、術者の経験に照らし合わせて、子宮鏡下筋腫核出術(TCR)、腹腔鏡下筋腫核出術(LM)、腹腔鏡補助下筋腫核出術(LAM)、開腹子宮筋腫核出術のいずれかを選択する。

一般に術前のGnRHアゴニスト投与は、筋腫の縮小効果が期待でき、術中の出血軽減につながることで、月経停止により貧血改善に寄与することから、推奨されているが、症例の年齢などからできるだけ早期の手術が望ましく、また貧血を認めず、術中の出血がそれほど多量にならずに手術可能と判断し、かつ、施設において手術が早期に施行できる場合には、GnRHアゴニスト投与を省略することも考慮する。

術後の避妊期間は、以前は半年～1年とすることが一般的であったが、近年の高齢不妊症例の増加により、施設によっては避妊期間を短くしているところもある。当科では、TCR後の避妊期間は3カ月間、それ以外の術式については、34歳以下は6カ月間、35歳以上の症例については3か月間としているが、避妊期間とその後の妊娠中の合併症(特に子宮破裂の発症率)の関連

については、明確なエビデンスはないため、今後の大規模な検討が必要である。

筋腫が明らかに不妊の原因とはいえない場合は、あとに述べる手術による妊孕性低下の可能性も考慮して、不妊治療を先行する。34歳以下の卵巣予備能の保たれた症例に対しては、ほかに不妊因子がなければ原因不明不妊と同様に扱ってよいと思われるが、35歳以上(特に40歳以上)の高齢不妊症例では、子宮筋腫が着床障害の原因となっているかどうかを早期に確認する必要があり、早期のART導入をすすめる。年齢にかかわらず、良好胚の単一胚移植を2回以上行って妊娠に至らない場合は、子宮筋腫による妊孕性低下の可能性を考え、筋腫核出術をすすめる。なお、特に高齢不妊症例においては、手術待ち時間、GnRH投与期間、術後避妊期間による時間のロスを考慮し、凍結保存胚を確保しておくことが望ましい。なお、手術先行が望ましいと判断される場合でも、高齢不妊症例に対しては、手術前に採卵、良好胚の凍結を行った上で手術を行う選択もある<sup>5)</sup>。

### 子宮筋腫を核出することにより、どの程度の妊孕性改善が見込まれるか

子宮筋腫が不妊の原因と想定される場合、次に問題となるのは筋腫が不妊原因の中のどれだけの割合を占めているか、すなわち手術によりどの程度の妊孕性改善が見込まれるか、である。ここで重要なことは、不妊が主訴である場合は、手術優先の方針であっても卵管因子、男性因子など他のスクリーニング検査を必ず行っておくべきである。たとえば男性因子の検索により *sever male factor* のため卵細胞質内精子注入法(ICSI)が必須と考えられる場合は、手術による卵管因子への影響をそれほど考慮する必要がなくなる、ということになるし、また術後すぐのART導入を予定している高齢症例では、卵

巣予備能に関する検索は必須であり、術前の凍結胚保存を行うことで、手術は行ったがその後ARTを行ってもまったく良好胚ができない、といった問題が回避できる。

術前のARTで良好胚ができない場合や、症例が43歳以上の場合は、手術により全体的な妊孕性改善を期待することは困難と考える。最終的には患者のインフォームドチョイスによるが、手術に対する過度な期待をもたせないよう努めるべきである。

### 不妊治療を優先した場合、また筋腫核出術を優先した場合の各々のリスク・ベネフィットについて、十分な説明を受け、患者が納得しているか

不妊の主訴の有無によらず、前医にて子宮筋腫を指摘された場合、医師より手術をすすめられ、または患者本人が手術を希望し、手術可能な施設を紹介受診してくることは多いが、特に手術適応が明らかな場合、手術のリスクについて十分な説明のないまま、手術直前の説明の際にトラブルとなることがある。こうしたトラブルを回避するため、東京大学附属病院女性診療科・女性外科では、子宮筋腫核出術を予定する症例に対して、生殖医療・内視鏡手術担当医が以下の事項を文書により説明するよう、義務付けている。

#### 1. 手術のリスク

- ①腹部に傷が残る(LM<LAM<開腹)
- ②手術に伴う、合併症、副作用の可能性
- ③術後の癒着により、不妊となる可能性(開腹術、多発筋腫の場合に、よりリスクが高い)
- ④筋腫の位置によっては、核出、縫合の際に卵管の通過性が悪くなり、不妊となる可能性
- ⑤術後妊娠した場合、妊娠中の子宮破裂のriskがある
- ⑥子宮破裂の予防のために、帝王切開の可能性が高くなる(術者の判断により、経膈分娩が

不可能となることもある)。

#### 2. 経過観察とした場合のリスク

- ①筋腫が不妊の原因となっている可能性
- ②筋腫により月経過多となっている場合は、症状増悪
- ③筋腫が増大した場合、腹腔鏡下手術が不可能となる
- ④筋腫が増大した場合、周囲臓器の圧迫により腫瘍感、頻尿、便秘が増悪、また静脈圧迫による血栓症、尿管圧迫による水腎症を起こす可能性
- ⑤妊娠した場合、筋腫による変性痛、胎児発育遅延、流産、胎盤早期剥離、分娩の障害、子宮収縮不全による出血多量をきたす可能性がある
- ⑥子宮筋腫と術前に診断されていても、まれに術後に悪性腫瘍と診断されることがあり、経過観察中に病期が進行する可能性がある

### 子宮筋腫合併不妊症例に対する治療方針

以上のことを踏まえた上で、子宮筋腫合併不妊症例に対する治療方針をまとめた。

#### 1. 卵巣予備能が十分ある症例

筋腫が明らかに不妊原因と考えられる場合は手術先行。明らかな不妊原因でないと考えた場合は、ほかに不妊因子がなければ原因不明不妊として不妊治療先行。ARTにより、良好胚移植を2回以上行っても妊娠に至らない場合は筋腫核出術を考慮。基本的に術前GnRH投与を行うが、筋腫が小さく、術中出血が少ないと見込まれる場合は省略可能。術後3カ月～6カ月の避妊期間後、不妊治療を行う。

#### 2. 卵巣予備能が低下した症例

筋腫が明らかに不妊原因と考えられる場合は手術先行。早期の手術が可能であればGnRHを省略することも考慮する。手術待ち期間、筋腫および卵巣の位置関係によっては、手術前に採

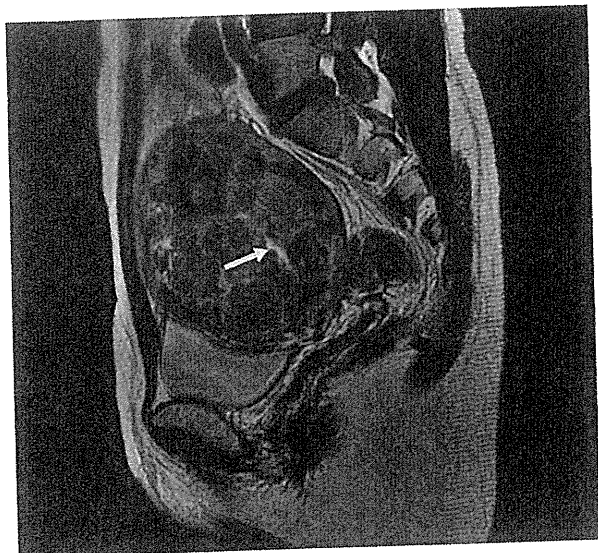


図1 術前MRI所見  
白矢印が子宮内膜

卵を行い、良好胚の凍結を考慮する。また、卵巣の予備能を確認し、良好胚ができるかどうかの判定のためにも、術前の採卵、胚凍結は有用である。術後3カ月で妊娠を許可する。

筋腫が不妊原因かどうか不明の場合は、着床障害の有無を確認するため早期のARTをすすめる。良好胚2回移植にても妊娠に至らない場合は手術をすすめる。できれば凍結胚を確保した上での手術が望ましい。

### 参考：多発子宮筋腫に対し、筋腫核出術後妊娠、分娩に至った症例

子宮の筋層内、粘膜下に無数の筋腫を認める症例で、特に術後の妊孕性温存を希望する場合は、術中出血、手術の完遂度、術後再発、術後Asherman症候群など、様々な問題を有する。今回われわれは、無数の筋腫に対し、可及的に筋腫核出を行ったのち、妊娠、分娩に至った症例を経験した。

〔症例〕 36歳 0回経妊

〔現病歴〕

32歳時、子宮筋腫および貧血指摘されるも、治療は行わず、鉄剤にてフォロー。36歳にな

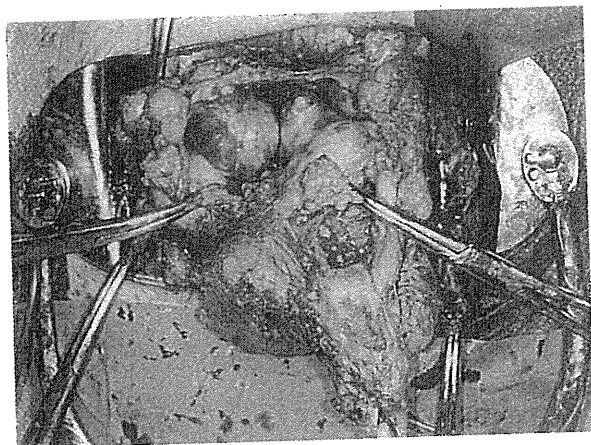


図2 手術時 内腔開放時所見

り、挙児希望出てきたため近医受診。最大径6cmの多発筋腫を認めたため、手術目的に当科紹介受診された。GnRHアゴニスト3course投与、自己血800mL準備した上で開腹子宮筋腫核出術の方針となった。

〔超音波〕

(GnRH投与後)子宮全体で115×81mm 最大の筋腫49×46mm

〔MRI〕

(GnRH投与後)子宮筋層内、粘膜下に最大5cmの無数の筋腫を認める(図1)。

〔手術経過〕

下腹部正中切開約8cmにて開腹。1/100希釈バゾプレッシンを10~20mL局注しながら筋腫核出。途中、インジゴカルミン液をHSG用カテーテルより注入し、子宮内腔を確認しながら開放した(図2)。内膜の損傷を最小限にするべく、厚みを指で確認しながら、突出度の低い筋腫は筋層側から、突出度の高い筋腫は内膜側から切除した。摘出物は24個、225g(図3)。内膜は3-0バイクリル®で修復。筋層は2-0バイクリル®を用いて、止血をしながら3-4層に縫合し、子宮切開部にセプラフィルム®を貼布した。子宮内腔癒着予防のため、FD-1®を挿入。手術時間2時間7分、出血990mL。自己血輸血800mL施行。

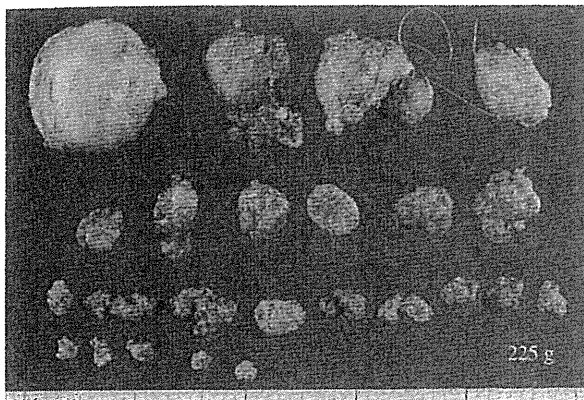


図3 摘出標本

#### 〔術後経過〕

子宮内膜再生の目的に術後エストロゲン製剤投与。術後3カ月FD-1<sup>®</sup>抜去。術後6カ月より妊娠許可し、natural-IUI 2 cycle 行うも妊娠に至らず、早期の妊娠を目指すため、ARTの方針となった。

術後9カ月：子宮鏡検査にて、内腔に突出する小筋腫再発を認めたが、内膜再生の良好な部分も多いため、良好胚移植にて妊娠に至らなければ子宮鏡下手術の方針となった。

術後11カ月：long protocolにてCOH施行。発育卵胞数25個、採卵20個。卵巣過剰刺激症候群(OHSS)回避目的にて、胚移植キャンセル

し、胚盤胞3個を含む、7個の胚を凍結。

融解胚移植の方針としていたが、採卵直後の周期に自然妊娠成立。妊娠中は問題なく経過し、妊娠37週1日、選択的帝王切開術施行。腹腔内に明らかな癒着なく、3,082g女児をスムーズに娩出。

#### ●文献

- 1) Pritts EA, et al : Fibroids and infertility : An updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril* 2009 ; 91 : 1215-1223.
- 2) Oliveira FG, et al : Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004 ; 81 : 582-587.
- 3) Olive DL, et al : Fibroids and reproduction. *Semin Reprod Med* 2010 ; 28 : 218-227.
- 4) Yoshino O, et al : Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. *Hum Reprod* 2010 ; 25 : 2475-2479.
- 5) Kuroda K, et al : Surgery-assisted reproductive technology hybrid therapy : A reproductive procedure for an infertile woman of late reproductive age with multiple myomas. *J Obstet Gynaecol Res* 2009 ; 35 : 827-831.

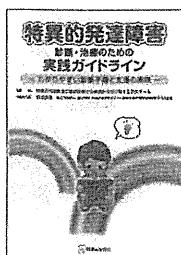
#### 著者連絡先

〒113-8655

東京都文京区本郷7-3-1

東京大学医学部附属病院女性診療科・産科

藤本晃久



## 特異的発達障害 診断・治療のための実践ガイドライン

特異的発達障害の臨床診断と治療指針作成に関する研究チーム 編  
国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的障害研究部部长 稲垣真澄 編集代表

●B5判・148頁・定価3,990円(本体3,800円)税5% ISBN978-4-7878-1781-5

●特異的読字障害・特異的算数障害の診断用検査シートと詳細な解説から成るガイドライン。特異的発達障害を的確に判断・支援できる。小児科医はもちろん教育関係者も必読の一冊。

 診断と治療社

〒100-0014 東京都千代田区永田町2-14-2山王グランドビル4F

電話 03(3580)2770 FAX 03(3580)2776

http://www.shindan.co.jp/ E-mail: eigyobu@shindan.co.jp

## 原 著

## 原因不明ならびに卵管因子不妊症例に対する腹腔鏡検査・治療の意義

東京大学医学部附属病院 女性外科<sup>1)</sup>、ひろいウイメンズクリニック<sup>2)</sup>小泉美奈子<sup>1)</sup>、廣井久彦<sup>2)</sup>、大須賀穰<sup>1)</sup>、藤本晃久<sup>1)</sup>、甲賀かをり<sup>1)</sup>、平池 修<sup>1)</sup>、百枝幹雄<sup>1)</sup>、矢野 哲<sup>1)</sup>、武谷雄二<sup>1)</sup>

## The efficacy of laparoscopy in the diagnosis and management of unexplained and tubal infertility

Minako Koizumi<sup>1)</sup>, Hisahiko Hiroi<sup>2)</sup>, Yutaka Osuga<sup>1)</sup>, Akihisa Fujimoto<sup>1)</sup>, Kaori Koga<sup>1)</sup>,  
Osamu Hiraike<sup>1)</sup>, Mikio Momoeda<sup>1)</sup>, Tetsu Yano<sup>1)</sup> and Yuji Taketani<sup>1)</sup>  
the University of Tokyo<sup>1)</sup>, Hiroi Women's Clinic<sup>2)</sup>

**Objective:** The efficacy of diagnostic laparoscopy should be re-considered due to the improved success rate of assisted reproductive technologies (ART).

**Methods:** We retrospectively reviewed clinical records of 126 women who were examined by both hysterosalpingography (HSG) and diagnostic laparoscopy for unexplained and tubal infertility, and of 186 women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) due to unexplained infertility, between January 2002 and December 2009 in the Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokyo.

**Results:** The mean age of patients undergoing laparoscopy was  $33.2 \pm 3.7$  years and the mean duration of infertility at first visit was  $40.6 \pm 26.6$  months. In assessing for tubal patency, laparoscopic findings differed from HSG findings in 45 women (35.7%). The cumulative pregnancy rate without ART after laparoscopic surgery was 42.4%. We compared the pregnancy rates between patients with normal tubes and those with abnormal tubes, who were treated during laparoscopy. The pregnancy rate of the patients with abnormal tubes was relatively high (64.3%) compared with that of the patients with normal tubes (36.5%) ( $P = 0.06$ ). The cumulative pregnancy rate of patients undergoing IVF-ET was 52.7% (mean age:  $37.4 \pm 3.7$  years old); that of patients over 40 years old was 28.4%.

**Conclusions:** The evaluation of tubal pathology by HSG alone can be limited. Laparoscopic surgery can be a useful adjunct in accurate diagnosis of infertility and improvement of fecundity, especially for patients with tubal pathology that can be treated laparoscopically. However, older women may still require further IVF-ET treatments.

## 緒 言

不妊症に対する腹腔鏡検査は骨盤内病変の診断のためのgold standardであり、卵管の疎通性の診断だけでなく卵管周囲癒着の診断に優れている。これまで、腹腔鏡検査は、卵管病変の診断のほか、一般不妊治療で妊娠に至らない場合の精密検査として位置づけられてきた。しかし、近年の生殖補助医療（ART assisted reproductive technology、以下ART）の普及と妊娠率の向上に伴い、腹腔鏡検査の意義が問われている。

当科では、クラミジアの既往などの卵管因子が

疑われる場合や、一般不妊で妊娠に至らない場合に腹腔鏡検査を施行し、病変のあった症例に対して卵管周囲癒着の剥離や内膜症病変に対する焼灼術を施行している。また、異常所見を認めなかった症例に対しても、術後の妊娠率向上を目的として卵管大量通水法や腹腔内洗浄を行っている。今回の検討で、腹腔鏡検査及び治療の有用性を再検討するために、当科で施行した腹腔鏡検査及び治療について、腹腔内病変の診断（特に卵管因子について）と術後の妊娠予後について検討を行った。

## 対象及び方法

2002年1月より2009年12月までの8年間に、当院で術前診断が原因不明不妊(83例)ならびに卵管因子不妊(43例)で腹腔鏡検査・治療を施行した126症例を対象とした。なお、卵巣嚢腫摘出術、子宮筋腫核出術、FT(Falloposcopic Tuboplasty)を術中に施行した症例は除外した。患者の平均年齢は $33.2 \pm 3.7$ 歳(25-41歳)、初診時不妊期間は $40.6 \pm 26.6$ か月(6-132か月)であった。

まず術前子宮卵管造影(HSG hysterosalpingography、以下HSG)による診断と術中所見を比較した。術中所見としては、①両側の卵管閉塞または高度の腹腔内癒着のためにARTの方針となった群(高度癒着群)②片側の卵管病変を認め、手術操作により解除されなかった群(片側卵管病変群)③卵管病変を認めたものの、手術操作により卵管周囲癒着が解除され、卵管通過を認め自然妊娠が望める状態に改善された群(卵管修復群)④卵管病変を認めない群(卵管異常なし群)に分類した。次に、術後半年間以上の経過を確認できた症例のうち卵管所見に異常を認めなかった52例(卵管異常なし群)と卵管異常を認めたものの修復できた14例(卵管修復群)の計66例について、術後2年間のART以外の方法による妊娠について比較検討した。HSGの診断は不妊を専門とする複数の医師が担当した。

さらに、同時期(2002年1月より2009年12月)に原因不明不妊の診断で当院においてARTを施行した186症例を対象とし、累積妊娠率、初回採卵での妊娠率を求めた。患者の平均年齢は $37.4 \pm 3.9$ (26-45)歳であった。

原因不明不妊症の診断は、月経2日目から5日目までのホルモン検査値、黄体中期のホルモン検査値、HSG所見、クラミジア抗体価、精液検査、性交後試験のすべてで異常を認めない症例とした。

腹腔鏡検査は、全身麻酔下に行い、CO<sub>2</sub>ガスによる気腹法を用いた。臍下に12mmのトラカールをopen法により挿入し、下腹部に5mmのトラカールを一か所ないし二か所挿入して手術操作を行った。卵管及び卵巣周囲の癒着が確認された場合には癒着剥離術を、また内膜症病変に対しては病変焼灼術を行った。卵管の疎通性は、100倍希釈のインジゴカルミン溶液を子宮マニピュレーターから注入し、流出の有無で判断した。疎通性の確認後、卵管の機能改善を目的として200mlの生理食塩水を子宮マニピュレーターから注入した<sup>1)</sup>。

ARTの誘発方法はGnRH agonistを用いたlong法またはGnRH antagonist法を用い、月経3日目よりhMG投与を開始した。主席卵胞径が18mmとなったところでhCG 1万単位を投与し、34時間後に採卵を施行、72時間後に胚移植を施行した。凍結胚が得られた場合は、自然周期またはホルモン補充周期にて凍結融解胚移植を行った<sup>2)</sup>。

統計学的解析は $\chi^2$ 検定を用いた。p<0.05を統計学的に有意と判定した。

## 結 果

腹腔鏡検査を施行した126症例のうち、HSGによる術前所見と術中所見の相違を43症例(34.1%)に認めた。特に、術前にHSGで卵管因子が疑われた86症例のうち、37症例(43.0%)の症例では実際に術中所見で卵管因子を認めなかった。一方で術前診断において卵管因子を指摘されなかったにも関わらず、術中所見で卵管因子を認めた症例は40症例中6症例(15.0%)と少数であった(図1)。腹腔鏡検査で実際に卵管因子を認めたのは55症例であり、そのうち手術で改善しえたのは22症例(40.0%)にとどまった(図2)。この22症例(卵管修復群)の中で、半年間以上経過を確認できた14症例のうちART以外での妊娠は9症例(64.3%)であった。一方、卵管因子を認めなかった71症例(卵管異常なし群)のうち経過を確認できた52症例では、妊娠症例が19症例(36.5%)であり、卵管修復群で術後妊娠率が高い傾向にあった(P=0.06)(図3)。なお、両群の患者の年齢に有意差は認めなかった。妊娠予後を検討した卵管修復群及び卵管異常なし群におけるART以外での全体の妊娠率は42.4%(28/66例)であり(図3)、腹腔鏡手術から妊娠までの期間の平均は6.4ヶ月(1-24ヶ月)であった。6ヶ月以内の妊娠が60.7%(17/28例)であり、1年以内の妊娠が85.7%(24/28例)であった(図4)。

原因不明不妊でARTを施行した186症例中累積

図1 HSGによる診断と術中所見の比較

	術中所見		計
	卵管因子あり	卵管因子なし	
HSGの診断			
卵管因子疑いあり	49	37	86
卵管因子疑いなし	6	34	40
計	55	71	126



図2 腹腔鏡検査の結果

卵管因子あり	55	(43.7%)
高度癒着群	19	(34.5%)
片側卵管病変群	14	(25.5%)
卵管修復群	22	(40.0%)
卵管因子なし (卵管異常なし群)	71	(56.3%)
計	126	

図3 術後の妊娠予後  
それぞれの群の妊娠率と全体の妊娠率を頻度として示した。

	妊娠例	非妊娠例	計
卵管修復群	9 (64.3%)	5	14
異常なし群	19 (36.5%)	33	52
計	28 (42.4%)	38	66

図4 術後の累積妊娠率

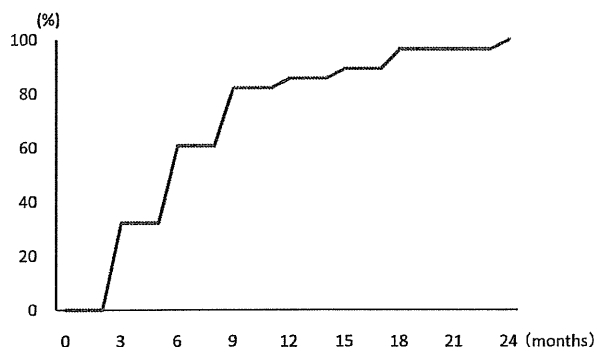


図5 原因不明不妊症例に対するARTの治療成績

	全体	40歳以上
累積妊娠率	52.7% (98/186)	28.4% (19/67)
初回採卵での妊娠率	30.6% (57/186)	17.9% (12/67)

妊娠率は52.7% (98/186例) であり、初回採卵での妊娠率は30.6% (57/186例) であった。また、40歳以上の患者の累積妊娠率は28.4% (19/67例)、初回採卵での妊娠率は17.9% (12/67例) であった (図5)。

## 考 察

今回の検討において、腹腔鏡検査の診断における有用性を示し、治療により術後の妊娠予後が期待できることを示した。特に、腹腔鏡検査・治療において卵管病変を修復した群において妊娠率が

高い傾向がみられた。今回の検討において、手術的に卵管障害を修復できた症例も原因不明不妊と合わせて母集団とした場合、全体の妊娠率は42.4%であり、原因不明不妊で腹腔鏡検査を施行したNakagawaらの報告 (48.9%)<sup>3)</sup> や石川らの報告 (33.6%)<sup>4)</sup> と同等の結果であった。腹腔鏡検査時に高度癒着や片側病変を修復できなかった症例では腹腔鏡の治療的意義は乏しいと考えられるものの、異常所見の検出に腹腔鏡検査が必要であったと考えられる。特に高度癒着例19症例 (15.1%) はARTの適応となり、治療方針の決定に有用であったといえる。Tsujiらの報告<sup>5)</sup> でも14.7%の症例が同様に腹腔鏡検査の結果ARTの方針となったことから、腹腔鏡検査の治療方針決定に対する有用性を述べている。

HSGは卵管因子の評価に用いられるが、卵管周囲癒着などの診断能力は腹腔鏡検査に比して劣ると考えられる。また、HSGで卵管疎通性が認められなくても実際には疎通性を認めることも少なくない<sup>6)</sup>。今回の検討でも、術前に卵管因子を指摘されたにも関わらず、実際には病変を認めなかった症例が43.0% (86症例中37症例) と半数近くに認められた。一方で、HSGで卵管因子が指摘されなかったにも関わらず、術中所見で卵管病変を指摘された症例も40症例中6症例 (15.0%) と多くはないものの認められた。このように、腹腔鏡検査によって診断の精度が高まることが期待できるが、その一方で腹腔鏡検査の有用性を疑問視する報告もある。FatunraらはHSG正常例において、その後の腹腔鏡検査でたとえ軽度の卵管周囲癒着などの異常所見があっても、治療方針の変更や治療による妊孕性改善の可能性は低いと述べている<sup>7)</sup>。また、LavyらもHSGにおいて正常あるいは片側のみの卵管の異常があった場合には、腹腔鏡検査を施行しても異常所見を指摘できる可能性は低く、治療方針に変更はないため、腹腔鏡検査をすべきではないと述べている<sup>8)</sup>。一方、Bullettiraらは、2560人の後方視的研究でHSG後と腹腔鏡検査後の妊娠率を比較し、腹腔鏡検査後 (50%) のほうがHSG後 (39%) に比して妊娠率が高く、妊娠に至る期間も短かったことを述べ、不完全な診断のもとでは適切な治療導入の遅れにつながると述べている<sup>9)</sup>。

今回の検討で、まずHSGによる診断が正確ではない可能性が示され、特にHSGで異常所見を認めたとにも関わらず腹腔鏡検査で異常を認めない症例が半数近くにみられた。これより、HSGで異常所

見を認めた場合には早期に腹腔鏡検査を施行し、診断を確定する必要があると考える。次に、腹腔鏡検査施行後の妊娠に関しては、卵管因子を有する症例において6割以上と比較的高い術後妊娠率を得られたことから、腹腔鏡検査は特に卵管因子不妊に対して有用な治療手段であるといえる。40歳以上の腹腔鏡検査後の妊娠予後は症例数が少なかったために検討できなかったが、腹腔鏡検査を選択した場合には妊娠に至るまでの時間的な問題があること、ARTの累積妊娠率が28.4%と比較的良好であることから、腹腔鏡検査の過程を経ずにARTを初めから導入することを考慮してよいと思われる。

本論文の要旨は第48回日本産婦人科内視鏡学会において発表した。

## 文 献

- 1) Hiroi H, et al: High incidence of tubal dysfunction is determined by laparoscopy in cases with positive Chlamydia trachomatis antibody despite negative findings in prior hysterosalpingography. *Reprod Med Biol* 2007; 6: 39-43.
- 2) Fujimoto A, et al: Predictive factors of successful pregnancy after assisted reproductive technology in women aged 40 years and older. *Reprod Med Biol* 2009; 8: 145-150.
- 3) Nakagawa K, et al: Laparoscopy should be strongly considered for women with unexplained infertility. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33: 665-670.
- 4) 石川智則 他：不妊症で腹腔鏡を施行した症例の予後、日本受精着床学会誌、2010：27：286-290.
- 5) Tsuji I, et al: Benefit of diagnostic laparoscopy for patients with unexplained infertility and normal hysterosalpingography findings. *Tohoku J Exp Med* 2009; 219: 39-42.
- 6) 小泉美奈子 他：当科における子宮鏡下選択的卵管通水法の成績、日産婦内視鏡会誌、2008；24：421-424.
- 7) Fatum M, Laufer N, Simon A: Should diagnostic laparoscopy be performed after normal hysterosalpingography in treating infertility suspected to be of unknown origin? *Hum Reprod* 2002; 17: 1-3.
- 8) Lavy Y, et al: Should laparoscopy be a mandatory component of the infertility evaluation in infertile women with normal hysterosalpingogram or suspected unilateral distal tubal pathology? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114: 64-68.
- 9) Bulletti C, et al: Pelvic factor infertility: diagnosis and prognosis of various procedures. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 73-82.

# 高度肥満を合併した汎発性腹膜炎の1例

Successful management of panperitonitis in a case with morbid obesity

東京大学医学部附属病院産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Tokyo Hospital

松本 玲央奈 Reona MATSUMOTO	嘉本 寛江 Hiroe KAMOTO	市川 麻祐子 Mayuko ICHIKAWA
樋口 紗恵子 Saeko HIGUCHI	後藤 美希 Miki GOTO	平池 修 Osamu HIRAIKE
藤本 晃久 Akihisa FUJIMOTO	大須賀 穰 Yutaka OSUGA	矢野 哲 Tetsu YANO
	武谷 雄二 Yuji TAKETANI	

**概要** 症例は43歳3G3P。身長163cm, 体重120kg, BMI 45.2と高度肥満を認めていた。下腹痛, 発熱を主訴に前医受診。画像上, 子宮内膜症性卵巣嚢腫破裂を疑われ, 当院に搬送された。抗生剤による保存的治療にて改善乏しく開腹手術施行。腹腔内に大量の膿貯留を認め, 可及的に腹腔内洗浄, ドレナージを施行した。しかし, 術後感染のコントロールが不十分であり, 付属器膿瘍の再燃, 右横隔膜下膿瘍を疑われた。また, 創部筋膜離開をきたしたため, 再手術の方針となり, 両側付属器摘出, 膈上部切断および腹腔内ドレナージを施行した。閉腹の際, 腸管浮腫が著明であり, 一期的閉鎖は不可能であったため, メッシュを筋膜欠損部に縫着し, 閉鎖した。術後経過は概ね良好であり, POD48リハビリ目的に前医転院となった。本症例は高度肥満に汎発性腹膜炎を合併し, 創部離開のリスクが極めて高かったと考えられ, 離解予防のための術前, 術中, 術後の管理を必要とした。また, 高度肥満の上に腸管浮腫が著明である場合, 無理な閉鎖により腹腔内圧上昇をきたし, 多臓器不全となるリスク(ACS)があることを念頭に置く必要がある。本症例においては吸収性メッシュを用いることで腹腔内圧を下げ, ACSのリスクを軽減しえたと考えられた。

**Key words** : 高度肥満, 汎発性腹膜炎, ACS

## 緒言

肥満症例に対して外科的処置を行う際に, 手術自体の困難さに加え創部離開, 血栓塞栓症など, 周術期において様々な合併症を生じるリスクがあることが知られている。今回, 我々はBMI 45以上の高度肥満に汎発性腹膜炎をきたした1例を経験した。初回術後に創部離開をきたし, 再手術となったもののその後の経過は概ね良好であった。高度肥満症例に対する手術時の注意点として若干の文献的考察を加え, 報告する。

## 症例

**患者** : 43歳, 3経妊3経産。身長163cm, 体重120kg, BMI 45.2。

**既往歴** : 19歳 椎間板ヘルニア手術, 28歳 急性虫垂炎手術, 31歳 高血圧指摘(無治療), 31歳 子宮内膜症指摘(フォローなし), 40歳 脳出血(左半身不全麻痺)。

**現病歴** : 40℃の発熱あり, 近医受診。尿路感染症を疑われ抗生剤処方された。翌日強い右下腹部痛出現, CTにて11cmの右卵巣腫瘍疑われ前医紹介受診。右卵巣腫瘍破裂, 骨盤内感染が疑われ, CTMを投与され

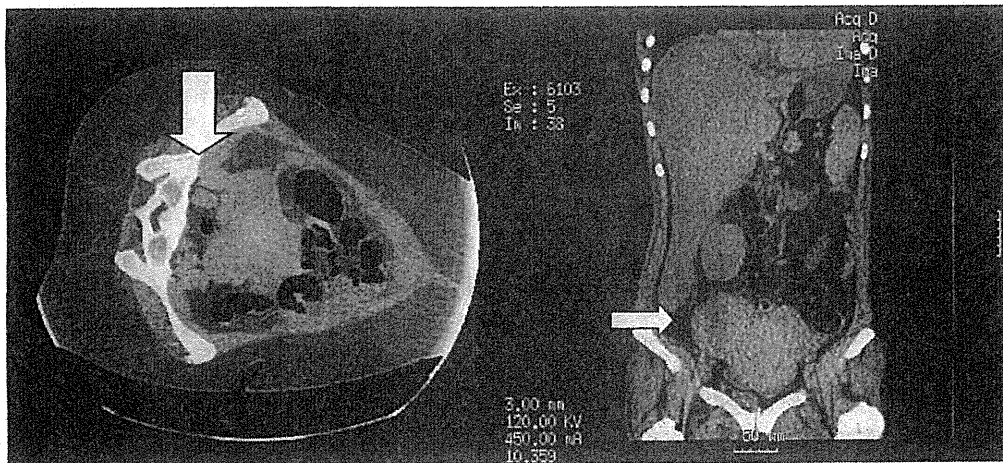


図 1.

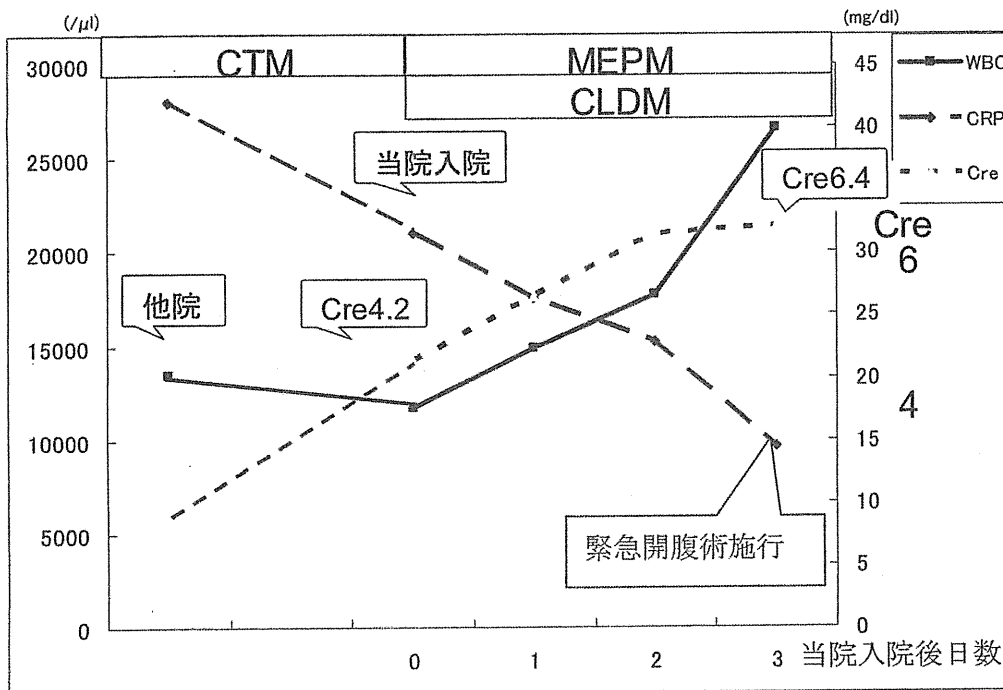


図 2

たが、症状の改善を認めず、同院での開腹手術を予定したが、麻酔科が高度肥満を理由に手術不可能と判断、当院へ搬送となった。

入院時所見：体温 38℃， 血圧 136/80mmHg， 脈拍 100 回/分。

血液検査所見：WBC 11700/μl (Neutro 83.9%)， Hb 7.0g/dl， TP 5.6g/dl， Alb 1.9g/dl， BUN 70.8mg/dl， Cre

4.27mg/dl， CRP 31.55mg/dl。

超音波所見：子宮の後面に接して 65×38mm 大の多房性腫瘍あり。正常卵巣像は左右共に確認できず。腹水少量。

腹部骨盤単純 CT：前医にて指摘されていた 11cm 大の嚢腫はなく、嚢腫破裂が疑われた。骨盤内右に壁の厚い嚢胞構造が疑われ、骨盤内や肝表面に濃度の高

い液体があった。内臓症性嚢胞の破裂として矛盾はないと判断した(図1)。

入院後経過：抗生剤投与にてCRPは下降、熱も解熱傾向になったが、その後WBCは上昇し、感染は制御されているとはいえない状態であった。一方、腎機能は増悪しており、今後、腎機能、ひいては肝機能、呼吸

機能の増悪がおきるとMOFとなり予後が非常に悪くなることが予想されることから、手術、ドレナージの方針となった(図2)。

手術所見：腹腔内全体に大量の膿が貯留。両側付属器はそれぞれ一塊となっており、内部に膿の貯留を認めた。癒着も高度であり、感染巣の摘出は不可能と判断、腹腔内洗浄ドレナージ術のみ施行した(図3)。手術時間3時間36分、出血量180ml。

初回術後経過：POD4より創部下端より膿性の滲出液を認めた。POD6腹部CT施行。右卵巢膿瘍再燃、右横隔膜下膿瘍の可能性を指摘された。創上部の皮下で筋膜離開が疑われたため、創部全抜鉤施行。筋膜離開により腹腔内臓器が目視できる状態であった。感染のcontrol不良であり、また創部離開もあったため、POD8再手術の方針となった(図4)。

再手術時所見：両側付属器を含む骨盤内および右横隔膜下に膿の貯留を認めた。膈上部切断術、両側付属器摘出術、腹腔内洗浄ドレナージ術を施行。閉腹時、腹膜および腹直筋前鞘・後鞘部は、腸管の著明な浮腫のため、一次的閉鎖は不可能であった。このため吸収性メッシュ(デキソンメッシュ)2枚を用い、筋膜欠損部に2-0Vicrylを用いて縫着した。手術時間8時間15分、出血量4520ml(腹水等含む)輸血量2360ml(MAP10, FFP8)。

再手術後経過：再手術後は、創部離開を予防するた

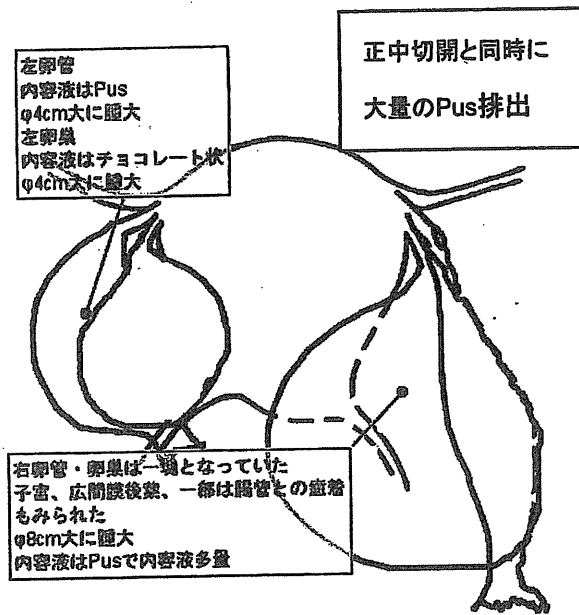


図 3

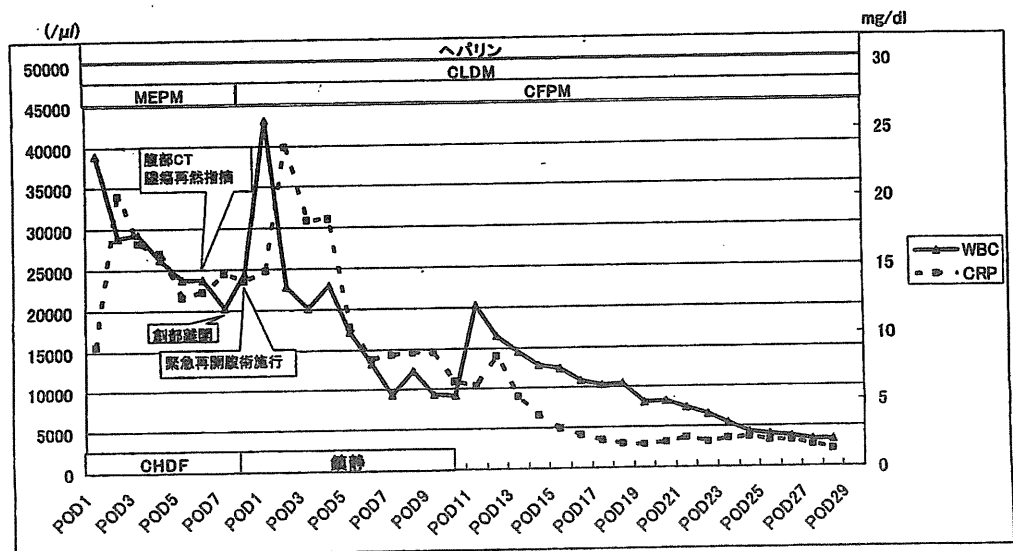


図 4

表1 創部離開のリスク因子

①宿主因子
低栄養 貧血 消耗性疾患 全身感染 肥満 高齢
動脈硬化 低酸素血症 腎不全 (人工透析)
肝障害 (肝硬変, 慢性肝炎) 糖尿病
ビタミンC, K 欠乏症 ステロイド投与
②局所因子
縫合部の血流障害 縫合部の過緊張
③二次的因子
腹腔内膿瘍

めに人工呼吸器下に鎮静をかける方針となった。また、膀胱内圧を測定し腹腔内圧のモニタリングを行った。その後は炎症反応改善傾向であり、23PODにドレーン抜去。POD48リハビリ目的に前医転院となった。

### 考 察

本症例において、2度の開腹手術を経験したが、1度目の開腹手術の際、術後創部離開を起こした。創部離開のリスクとしては、表1に示すものが挙げられる。本症例においても、下線に示す因子を満たしており、創部離開のリスクは極めて高かったといえる。

創部離開の対策としては、術前であれば全身状態改善、血糖コントロール。術中であれば術式選択、SSIの予防を念頭に置いた閉創。術後であれば周術期管理、呼吸器管理、血糖コントロールなどが挙げられる。本症例においては、2度目の手術の際、血栓予防を行いつつ人工呼吸器下に10日間の鎮静を行った。それにより創部への緊張を軽減することができ、創部離開を起こすことなく経過したと考えられる。

また、本症例においては特に再手術の際に閉腹に難渋したが、無理な閉腹によって、Abdominal compartment syndrome (以下ACS)を発症するリスクがあることが知られている。ACSはSepsis、腸管浮腫、血腫、無理な閉創などで腹腔内圧が上昇することによって惹き起こされる病態であり、腎機能・呼吸機能障害をきたし、多臓器不全となりうる。対策として、あえて閉創しない方法 (Open Abdomen Management 以下OA)、メッシュ等を用いて腹腔内圧減圧をはかる方法がある。

ACSは腹部の減圧がなされなければ致命的 (40~100% 致死)だが、OAによって生存率は33~100%に上昇する。ただしOAによって腸管瘻孔や、感染、腹

腔内膿瘍、MOFのリスクがある。OAのゴールは、ACSを引き起こすことのない状態で、できるだけ早く閉腹することである。閉腹のタイミングに関してのエビデンスはないが、血行動態が安定した後24~72時間で再手術としている。閉腹の際に最も重要なのは筋膜に過度のテンションがかからないことである。実際に閉腹するタイミングの報告は検索した限り、様々であった。閉腹を遅らせたほうが良い場合としては、腸管浮腫の遷延、前方の欠損、ARDS、腹膜炎、OAの遷延、臓器が腹壁に融合している場合などが挙げられる。

本例においては、メッシュを用いることにより、筋膜の減張をはかり、閉腹とした。また、術後膀胱内圧を測定し腹腔内圧のモニタリングを行い、ACSの早期発見に努めたが、結果的にACSを引き起こすことなく順調に経過した。

### 結 語

今回、高度肥満を合併した汎発性腹膜炎に対し、2度の開腹手術を施行した1例を経験した。本症例のように高度肥満合併の腹膜炎を認め、また全身状態不良である場合、創部離開のリスクが極めて高くなる。このため創部離解予防のための術前、術中、術後の管理が重要となる。また、無理な閉創により腹腔内圧上昇をきたし、多臓器不全となるリスク (ACS)があることも念頭に置く必要がある。本症例においては吸収性メッシュを用いることで腹腔内圧を下げ、ACSのリスクを軽減しえたと考えられる。

(本論文の要旨は第356回日本産科婦人科学会東京地方部会例会で発表した。)

### 文 献

- 1) Campbell A, Chang M, Fabian T et al. Management of the open abdomen: from initial operation to definitive closure. *Am Surg* 2009; 75 (11 Suppl): S1-22
- 2) 清水潤三. 感染予防のための周術期管理 SSI 予防を念頭に置いた創閉鎖手技. *消化器外科* 2009; 32 (1)
- 3) 板橋道朗, 番場嘉子, 橋本拓造. 縫合不全に対する予防と対策 V. Poor risk 症例, 緊急手術. *日本大腸肛門病会誌* 2009; 62: 828-833
- 4) Iancu C, Mocan LC, Todea-Iancu D et al. Host-related predictive factors for anastomotic leakage

# Human spermatozoal RNAs

Toshio Hamatani, M.D., Ph.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

**Objective:** To provide a focused review of the scientific literature pertaining to spermatozoal RNA.

**Design:** Review of the literature and appraisal of relevant articles.

**Setting:** Not applicable.

**Patient(s):** Infertile male.

**Intervention(s):** None.

**Main Outcome Measure(s):** Spermatozoal RNAs as potential epigenetic modifiers in early embryo development and as clinical markers of male infertility.

**Result(s):** The nucleus of mature spermatozoa contains a complex population of mRNAs and miRNAs despite its transcriptionally inert state.

**Conclusion(s):** A specific set of functional RNAs are delivered into oocytes during fertilization and are thought to contribute extragenomically to early embryonic development. Even if spermatozoal RNAs is merely residual, it still has the potential to greatly improve the investigative and diagnostic potential of male infertility. (Fertil Steril® 2012;97:275–81. ©2012 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Sperm, RNA, miRNA, paramutation, microarray

Over the past decade, it has been documented that the nucleus of mature spermatozoa contains a complex population of RNAs that are transcriptionally inert. Upon fertilization, the spermatozoon delivers specific functional RNAs into the oocyte and these RNAs contribute extragenomically to early embryonic development. Even if spermatozoal RNAs are not proven to be functional, they may still serve as investigational and diagnostic tools for male infertility. Although microscopic evaluation based on sperm count and motility have been primarily used to diagnose male fertility, a normal semen profile does not guarantee fertility. Recently, the global analysis of spermatozoal mRNAs by microarray technologies has further contributed to our understanding of mRNA complexity which ultimately may lead to the discovery of clinical markers for male infertility.

## TRANSCRIPTIONAL AND TRANSLATIONAL ACTIVITY IN MATURE SPERMATOOZOA

Mammalian spermatogenesis consists of 3 phases of differentiation: mitotic,

meiotic and post-meiotic (spermiogenesis), beginning at the spermatogonial stages to eventual formation of spermatozoa. It includes haploidization and remarkable morphological changes such as the loss of cytoplasm and the formation of the acrosome and flagellum. Spermatozoal DNA, initially packaged by histones, is gradually repackaged by protamines during spermiogenesis (the haploid phase of spermatogenesis) to achieve nuclear compaction (1). By comparison, RNA synthesis, as measured by <sup>3</sup>H-uridine incorporation and autoradiography, increases dramatically in early-pachytene spermatocytes and decreases in mid-pachytene spermatocytes. Although RNAs synthesized during meiotic prophase are found in spermatids, transcriptional activity is then continuously shutdown during spermiogenesis to allow chromatin repackaging (2).

Mature spermatozoa have a highly condensed chromatin architecture with protamines and little cytoplasm, which led to the long held view that mature spermatozoa are inert cells. Spermatozoal nuclei contain RNA polymerase

and abundant transcription factors (3), but a recent study by Grunewald et al. (4) failed to show any incorporation of radiolabeled uridine in ejaculated spermatozoa, suggesting a lack of intrinsic transcriptional activity in human mature sperm cells. It is now agreed that transcriptional and translational activities are present in the mitochondria of mature spermatozoa, but not in the cytoplasm (5, 6). Mature spermatozoa had been thought to lack 28S and 18S rRNAs, the essential components of 80S cytoplasmic ribosomes to support translational machinery, however, 18S rRNA, but not the large subunit backbone 28S rRNA, was recently shown to be present in highly purified spermatozoal RNA after rigorous elimination of somatic cells (7). Transmission electron microscopy (TEM) showed a significant number of electron-dense ribosomal structures in the spermatozoal cytoplasm, but they were mostly irregularly dispersed and suggestive of monosomes (7). Taken together, these findings suggest that cytoplasmic ribosomes in mature spermatozoa are not functional. Polysomal fractions contain 55S mitochondrial ribosomes and the incorporation of labeled amino acids into polypeptides during sperm capacitation is inhibited by mitochondrial translation inhibitors but not a cytoplasmic translation inhibitor (8). It is possible that non-functional

Received December 13, 2011; accepted December 20, 2011.

T.H. has nothing to disclose.

Reprint requests: Toshio Hamatani, M.D., Ph.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Shinanomachi 35, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan (E-mail: toshiohamatani@z3.keio.jp).

Fertility and Sterility® Vol. 97, No. 2, February 2012 0015-0282/\$36.00  
Copyright ©2012 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.  
doi:10.1016/j.fertnstert.2011.12.035

cytoplasmic ribosomes in spermatozoa ensure that no post-fertilization translation of hazardous transcripts take place (7).

### mRNA IN MATURE SPERMATOZOA

The total spermatozoal RNA content per mature sperm is estimated to be 100 fg in rat (9), 5 fg in domestic swine (10), and 10–400 fg in human (11, 12). To ensure that these low levels of spermatozoal RNA are not artifactual, sperm preparation procedures should exclude contamination by somatic and round germ cells. Double swim-up or density gradient centrifugation followed by a hypotonic treatment is usually employed (13). RT-PCR analysis of purified spermatozoal RNA should confirm the absence of somatic cell markers such as CD45 and E-cadherin (14).

The first specific mRNA identified in mature human spermatozoa was c-MYC mRNA (15). Subsequent studies using RT-PCR analysis or in situ hybridization (ISH) have identified a number of specific transcripts in mature human spermatozoa including those encoding protamines, progesterone receptors, estrogen receptors, CYCLIN B1, STAT4, DAZL, SRY, and PLC- $\zeta$  (16). Some ISH studies on human spermatozoa demonstrated that RNA is localized at the periphery of the nucleus, close to the nuclear envelope, and constitutes a structural part of the nuclear matrix (9, 17, 18). Other studies show spermatozoal RNAs are located in the mid- and principle piece of the tail (15, 19). The existence of a complex population of mRNAs in mature human ejaculated spermatozoa was also revealed by transcriptomic profiling using oligo DNA microarrays (13).

### ROLE OF SPERMATOZOAL RNA

It was thought that spermatozoal RNA is comprised of remnants of untranslated mRNA during spermatogenesis. However, microarray analysis of mRNAs in human ejaculates suggests that the accumulated mRNAs in mature spermatozoa constitute a population of stable full-length transcripts that were consistently expressed from individual men between ejaculates, suggesting selective retention of RNAs during spermatogenesis (13). Furthermore, Miller et al. noted that there was selective retention of particular RNA species, including some that were premeiotically expressed testis-specific protein on the Y chromosome (the TSPY1 transcript can be detected in spermatozoal RNA), whereas the large subunit cytoplasmic 28S rRNAs were either removed or degraded (6). A functional role for these specific RNA species was observed by the finding that they were delivered to mouse oocytes and indeed detected in ensuing zygotes (20, 21). Using the hamster sperm penetration assay, clusterin and protamine-2 transcripts were shown to be consistently detected in human spermatozoa, but not in hamster oocytes, and were also shown to be retained in zygotes at 30 min and at 3 h post-fertilization (22). Spermatozoal transcripts such as the pregnancy-specific  $\beta$ -1-glycoprotein and human leukocyte antigen-E were even detectable 24 h after oocyte penetration (23). Furthermore, RNA encoding PLC- $\zeta$  was detected in mature spermatozoa and its injection into mouse eggs causes  $Ca^{2+}$  oscillations and egg activation (24). Taken together, these findings suggest that spermatozoal RNAs have an important role in early zygotic and embryonic development.

Spermatozoal RNA was shown to have a significant role in paramutations in a study showing that *Kit* mRNA microinjection into oocytes conferred non-mendelian inheritance by reverting the phenotype of a *Kit* tyrosine kinase receptor knockout (21). Paramutation is an allele-dependent transfer of epigenetic information, which results in the heritable silencing of one allele by another. This phenomenon was first observed in maize (25) and subsequently in a variety of plants (26). The *Kit* locus was first identified as an example of a paramutable gene in mice; *Kit*<sup>+/+</sup> homozygotes born from *Kit*<sup>-/+</sup> heterozygotes maintained and transmitted the white-spotted phenotype characteristic of the mutant heterozygote to their progeny (Fig. 1). This modified phenotype that has been efficiently inherited from either male or female parents had resulted from a decrease in *Kit* messenger RNA levels with the accumulation of non-polyadenylated RNA molecules of abnormal sizes in brain and testis in the heterozygotes. Although *Kit* transcription was essentially restricted to spermatogonia, with reduced levels in early meiotic cells in wild-type mouse germ cells (27–30), accumulation of the abnormal *Kit* RNA was observed in the mature epididymal sperm of the heterozygotes and paramutated mice. Microinjection of brain and sperm RNA from heterozygous mutants or of *Kit*-specific microRNAs into fertilized oocytes induced a heritable mutant phenotype (21). These experiments illustrated the concept of inheritance via RNA-mediated epigenetic changes and support the notion that the RNA delivered at fertilization can influence embryo development through epigenetic modifiers (16).

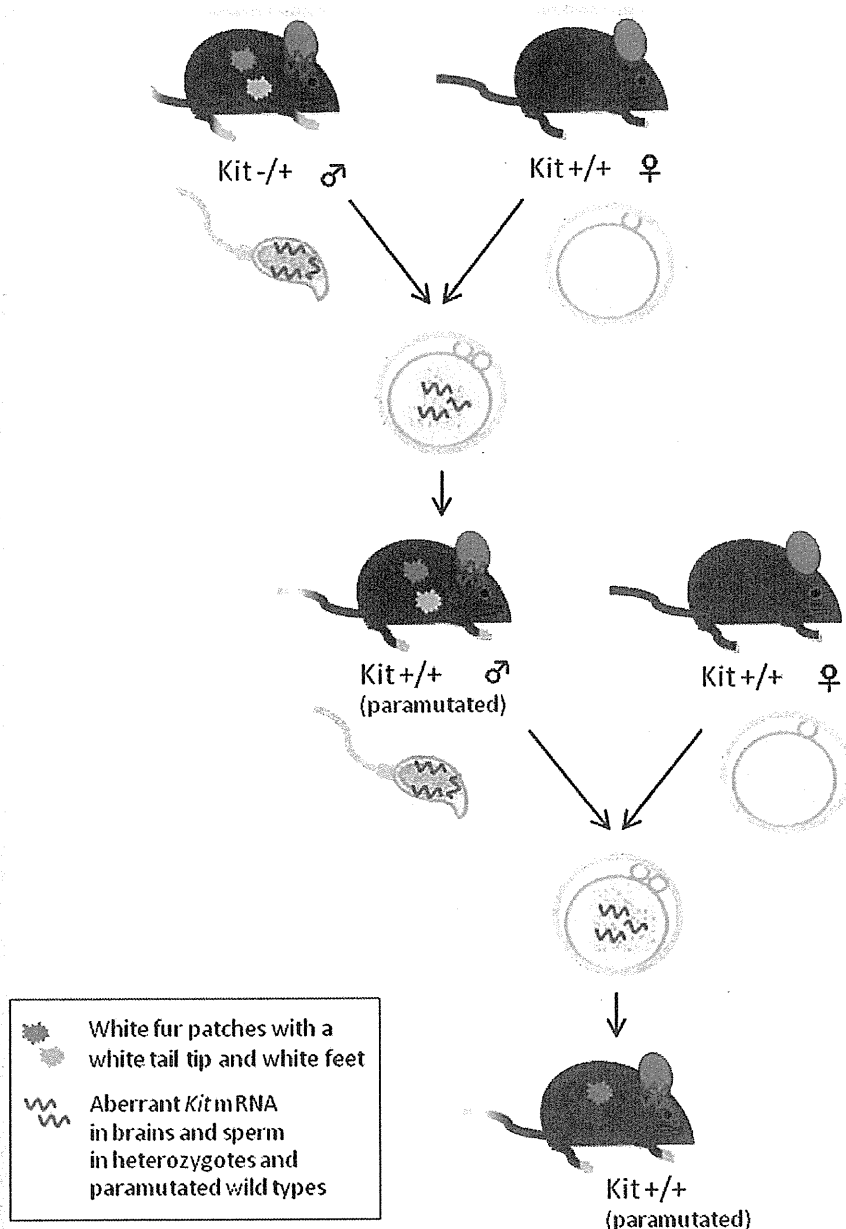
A dynamic role of spermatozoal RNAs in epigenetic reprogramming of spermatozoal chromatin was also proposed (31). During spermiogenesis, somatic histones were progressively replaced by transition proteins and then by protamines (32). The histone to protamine exchange process was incomplete, with a small percentage (5–15%) of the genome bound to nucleosomes in human (33, 34). Because RNA was a known component of the nuclear envelope, it is possible that spermatozoal RNA act to stabilize an interaction between the envelope and histone-bound DNA. Spermatozoal RNAs could have a passive role in chromatin reorganization or an active role in delineating or marking DNA sequences for histone packaging. A recent study (35) has shown that nucleosomes retained in sperm were not simply randomly distributed remnants of inefficient protamine replacement, but were instead significantly enriched at many loci important for embryo development, including genes encoding key embryonic transcription factors and signaling pathway proteins. Histones were also significantly enriched at the promoters of miRNAs and imprinted genes (36). Spermatozoal mRNA possibly facilitates the selective escape of nascent potentiated histone-bound sequences from repackaging by protamines, leaving them in the potentiated conformation and setting up the boundaries between protamine- and histone-packaged DNA.

### SMALL NON-CODING RNAs INCLUDING MICRO-RNAs (miRNAs) IN MATURE SPERMATOZOA

Post-transcriptional regulation of gene expression via small non-coding RNA molecules, including miRNA, is recognized



FIGURE 1



Paramutable inheritance of a modified phenotype via spermatozoal RNA. White fur patches, a white tail tip, and white feet are characteristic of the mutant heterozygote. Although *Kit* transcription is essentially restricted to spermatogonia and not found in mature spermatozoa, aberrant *Kit* mRNA (non-polyadenylated RNA of abnormal sizes) is accumulated in brain and sperm in the heterozygotes. *Kit*<sup>+/+</sup> homozygotes born from *Kit*<sup>-/+</sup> heterozygotes maintain and transmit the white-spotted phenotype to their progeny via spermatozoal aberrant *Kit* mRNA.

Hamatani. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril* 2012.

as an important mechanism in fine-tuning translational regulation during cell differentiation which is highly active during spermatogenesis (37). Increased miRNA levels coincided with the activation of large-scale gene transcription, peaking at the pachytene spermatocyte stage and the post-meiotic stage during spermatid development (38, 39). Very few studies have investigated miRNA expression in testicular tissues and purified populations of germ cells at different stages of maturation. One small scale quantitative RT-PCR (qPCR)

analysis consisted of 28 testis-specific miRNAs in cell populations isolated from mouse testes including Sertoli cells, spermatogonia, pachytene spermatocytes, round and elongating spermatids as well as spermatozoa (38). Microarray analysis has been performed on purified spermatogonia, spermatocytes and spermatids to examine global miRNA expression in these cell populations (40). These two studies revealed that most miRNA were preferentially expressed in the meiotic germ cells, and the former identified miRNAs, such as mir-t19 and

mir-t20, in mature mouse spermatozoa. Another study, using microarray and qPCR analysis, demonstrated that mouse mature spermatozoa contain a broad profile of miRNAs, and that potential mRNA targets of these miRNAs are expressed in metaphase II oocytes (41). However, coinjection of MII oocytes with sperm heads plus anti-miRNAs to suppress miRNA function did not perturb pronuclear activation or preimplantation development. Furthermore, expression levels of miRNAs in spermatozoa were low relative to those in oocytes. Thus, mouse spermatozoa miRNAs are suggested to play only a limited role in fertilization or early preimplantation development (41).

In humans, RNA isolated from the ejaculate spermatozoa of 6 normal fertile men was directly hybridized to detect oligonucleotide arrays containing 10,000 elements (42). This study revealed 68 shared RNAs, some of which were similar to those previously defined as miRNAs (e.g., mir-182), whereas others were the antisense of the previously computer-predicted transcripts. Furthermore, in a recent study RNAs of <200 bases in length were isolated from the ejaculates from three fertile men and used to generate RNAs of 18-30 nucleotides in length to construct sequencing libraries with the next-generation sequencer (43). The total number of reads that mapped to a single location in the human genome was 110,498, 276,923, or 492,096 in each library prepared from the three ejaculates. The bioinformatic analysis characterized multiple classes of small RNAs in human spermatozoa. The primary classes included miRNAs (~7%), Piwi-interacting RNAs (piRNAs) (~17%), and repeat-associated small RNAs that mapped to known repeat sequences including retrotransposon such as long terminal repeat (LTR) and non-LTR (short/long interspersed nuclear element [SINE/LINE]) (~65%). A minor subset of short RNAs within the transcription start site/promoter fraction (~11%) frames were histone promoter-associated regions enriched in genes involved in early embryonic development. piRNAs, originally thought to be absent from mature sperm, were observed for the first time. The sequence reads corresponding to a total of 1,137 piRNAs were shared among the three libraries. It has been proposed that piRNAs protect the genome from the deleterious effects of invasive elements (44) and/or perhaps the means to achieve confrontation and consolidation. In conclusion, the complex and large populations of small non-coding RNAs in human ejaculated spermatozoa might include modifiers of gene expression upon fertilization. Thus, these RNA molecules might play a role in early embryo development and may become potential markers of male fertility.

### SPERMATOZOAL RNAs AS CLINICAL MARKERS OF MALE INFERTILITY

Spermatozoal RNA, though designated to be residual and as yet not definitively proven to be involved in early embryo development, may still be useful as biomarkers for predicting male infertility. Protamines play a crucial role in sperm chromatin condensation and protection of the paternal genome from DNA damage. Sperm haplo insufficiency for the protamine-1 (Prm1) or protamine-2 (Prm2) genes resulted in aberrant sperm chromatin condensation and structure that failed to give rise to offspring in mice (45). Human protamine

genes, PRM1 and PRM2, were transcribed in the post-meiotic haploid spermatid, during early stages of spermiogenesis (46). Translation of PRM1 and PRM2 mRNAs were repressed until the elongation stage, leaving small amount of the protamine mRNAs retained in mature human spermatozoa (18). An aberrant PRM1/PRM2 protein ratio in ejaculated spermatozoa of infertile men is considered responsible for an unstable chromatin condensation leading to increased chances of DNA strand breaks (47, 48). In addition, a recent study demonstrated that the PRM1/PRM2 mRNA ratio in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa significantly differ between infertile men and fertile controls (49). Spermatozoa from the same semen sample evidenced higher level of PRM1 mRNA in low motile fractions than in its high motile counterpart (14). Abnormally elevated protamine mRNA retention in ejaculates was often associated with deregulation of protamine translation (50). Furthermore, levels of both PRM1 and PRM2 transcripts in ejaculated spermatozoa were lower in asthenozoospermic men than in fertile controls (51). Thus, protamine mRNAs appear to have a role in the formation of fully functional mature spermatozoa and as such, have potential as a diagnostic tool for male infertility.

Recent progress in RNA amplification methods and microarray platforms has enabled spermatozoa RNAs to be analyzed on a large scale. The global analysis of spermatozoal mRNAs using microarray technologies greatly contributed to the understanding of mRNA complexity in mature spermatozoa, and has revealed specific mRNA patterns that correlate with male fertility and infertility (52-56), teratozoospermia (57), smoking (58), and cryptorchidism effects (59).

Microarray profiling of spermatozoal RNAs from 24 healthy donors identified a series of invariable transcripts that were present in all the donor samples (12). In this study, gene expression in only one sample poorly correlated with the other 23 samples, suggesting that spermatozoal RNA profiling could be clinically applied to mark outliers. Another microarray study identified 157 transcripts in spermatozoa that were either up- or down-regulated in oligozoospermic infertile men compared to normospermic fertile individuals (56). In sperm of oligozoospermic infertile men, there was a remarkable reduction in expression of genes involved in spermatogenesis, sperm motility and germ cells anti-apoptotic process (e.g., *PRM2*, *SPZ-1*, *SPATA-4*, *MEA-1*, *CREM*) as well as a significant decrease in expression of genes involved in DNA repair (e.g., *NIPBL*), oxidative stress regulation (e.g., *PARK7*), and histone modification genes expression (e.g., *DDX3X*, *JMJD1A*) (56). Furthermore, microarray analysis in sperm from fertile and infertile men with normal semen parameters successfully demonstrated significant differences in spermatozoal mRNA profiling (53). Focusing on differentially-expressed genes showing at least a 10-fold difference in expression level, 136 genes were under-expressed but only 3 genes were over-expressed in sperm from infertile men. It was also notable that these genes encoded several ribosomal proteins and spermatogenesis factors that were unlikely to be related to controlling the number of sperm produced.

Garcia-Herrero et al. (60) compared the transcriptomic profile of spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection

(ICSI) cycles in an oocyte donation program and compared those that achieved a pregnancy (group P) to those that did not achieve pregnancy (group NP). Among 16,035 sequences that were commonly expressed in group P and NP, only 44 sequences were over expressed in group P versus NP and five in group NP versus P. Notably, the 44 differentially-expressed genes in group P included four cathepsins and six metallothioneins. Cathepsins are a family of cysteine proteases that likely prevent atrophy of seminiferous tubules and support spermatogenesis to pachytene spermatocytes (61, 62). Metallothioneins, on the other hand, function as detoxicants to prevent tissue damage of testes by heavy metals (63). Furthermore, the ontology analysis found 'embryo development ending in birth or egg hatching' as the top-ranked gene ontology (GO) term for 1,358 exclusively-expressed transcripts in group P. The exclusively-expressed genes corresponding to this GO term include adducin 1 (*ADD1*), activin A receptor type-II like 1 (*ACVRL1*), androgen receptor (*AR*), and aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator (*ARNT*). These genes can be considered as a potential pregnancy success markers rather than potential fertilization makers because of the fact that ICSI skips the physiological process of sperm entry.

In another study, Platts et al. (57) profiled human spermatozoal transcripts from 13 fertile males who had fathered at least one child and compared them to sperm from eight teratozoospermic individuals. The teratozoospermic group lacked RNAs encoded by genes related to the ubiquitin-proteasome pathway and those transcribed at late stages of spermatogenesis including an egg-activating sperm factor *PLCZ1*, acrosomal proteins such as *ACRV1* and *SPAM1*, and non-tubulin components of sperm tails, *ODF1-4*. These findings are indicative of the failure of late-stage spermatogenesis in teratozoospermia. All samples were successfully discerned between normal and teratozoospermic groups by unsupervised hierarchical clustering, suggesting diagnostic accuracy by spermatozoal RNA profiling.

Men with undescended testes have an increased risk of developing germ cell tumors and infertility. A microarray study was performed to identify differential spermatozoal RNA patterns between patients with cryptorchidism and controls. The mean semen volume was similar in controls and patients with cryptorchidism, but the mean sperm density was significantly lower in patients with cryptorchidism than in controls. Only 43 genes were differentially expressed between the two groups. Thirty-eight genes were significantly under-expressed in the cryptorchid samples, including many transcriptional factors (e.g., *CUL3*, *PRM1*, *HSPCD35*) and a testis-specific cell-adhesion gene (*TPX-1*) involved in germ cell maturation and sperm tail formation. By comparison, an anti-apoptotic gene (*TNFAIP3*) was highly over-expressed in the cryptorchid samples compared to controls.

Paternal exposure to genotoxic compounds is thought to contribute to diseases in the offspring. Transcriptomic profiles of ejaculated spermatozoa from four cigarette smokers were compared with four non-smokers. A total of 781 genes were found to be differentially expressed in spermatozoa of smokers compared to non-smokers. An additional 200 genes, including *SALF* and *TRIM26*, were selected on the basis of the

positive correlation between their expression levels and the concentration of cotinine in seminal plasma. Pathway analysis showed an enrichment in the spermatozoa of smokers of NF $\kappa$ B regulated genes that plays a central role in stress response. Thus in this instance, spermatozoal RNAs could also be useful biomarkers of male germ cell exposure to genotoxins.

The global analysis of spermatozoal mRNAs using microarray technologies has been employed to explore clinical markers for male infertility. However, an appropriate study design with a larger number of biological replicates rather than technical ones is necessary for accuracy and reproducibility of microarray data. It is also necessary to prepare sperm samples to eliminate contamination with somatic and round germ cells. If the genes identified as sperm quality markers by microarray studies are successfully attributed to pathogenesis of male infertility, then the microarray strategy could be used as a clinical diagnostic tool for male infertility.

## CONCLUSION

The nucleus of mature spermatozoa contains a complex population of mRNAs and miRNAs despite its transcriptionally inert state. A specific set of functional RNAs are delivered into oocytes during fertilization and are thought to contribute extra genomically to early embryonic development (e.g., paramutation phenomenon). Even if spermatozoal RNAs are merely residual, they still have the potential to greatly improve the investigative and diagnostic potential of male infertility. Recent advances in microarray technologies have enabled global analyses of spermatozoal mRNAs and have contributed further to the understanding of mRNA complexity and to the discovery of clinical markers for male infertility. Spermatozoal RNA profiling has the potential to identify sperm-related factors required for early development.

## REFERENCES

1. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139:287-301.
2. Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 2004;237:1-56.
3. Pittoggi C, Magnano AR, Sciamanna I, Giordano R, Lorenzini R, Spadafora C. Specific localization of transcription factors in the chromatin of mouse mature spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2001;60:97-106.
4. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 2005;37:69-71.
5. MacLaughlin J, Turner C. Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. *Biochem J* 1973;133:635-9.
6. Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2006;12:757-67.
7. Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess AN. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod* 2011;17:669-78.
8. Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev* 2006;20:411-6.
9. Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha II, Yanez A, Burzio LO. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:272-8.
10. Yang CC, Lin YS, Hsu CC, Wu SC, Lin EC, Cheng WT. Identification and sequencing of remnant messenger RNAs found in domestic swine (*Sus scrofa*) fresh ejaculated spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009;113:143-55.

11. Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* 2007;53:161-7.
12. Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med* 2009;87:735-48.
13. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360:772-7.
14. Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 2004;10:535-41.
15. Kumar G, Patel D, Naz RK. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res* 1993;39:111-7.
16. Dadoune JP. Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech* 2009;72:536-51.
17. Dadoune JP, Pawlak A, Alfonsi MF, Siffroi JP. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2005;11:133-40.
18. Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997;3:15-9.
19. Modi D, Shah C, Sachdeva G, Gadkar S, Bhartiya D, Puri C. Ontogeny and cellular localization of SRY transcripts in the human testes and its detection in spermatozoa. *Reproduction* 2005;130:603-13.
20. Hayashi S, Yang J, Christenson L, Yanagimachi R, Hecht NB. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003;69:1170-6.
21. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006;441:469-74.
22. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;429:154.
23. Avendano C, Franchi A, Jones E, Oehninger S. Pregnancy-specific (beta)-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod* 2009;24:270-7.
24. Sone Y, Ito M, Shirakawa H, Shikano T, Takeuchi H, Kinoshita K, et al. Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:690-4.
25. Brink RA. A Genetic Change Associated with the R Locus in Maize Which Is Directed and Potentially Reversible. *Genetics* 1956;41:872-89.
26. Chandler VL, Stam M. Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet* 2004;5:532-44.
27. Manova K, Nocka K, Besmer P, Bachvarova RF. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1990;110:1057-69.
28. Motro B, van der Kooy D, Rossant J, Reith A, Bernstein A, Sorrentino V, et al. Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1991;113:1207-21.
29. Sorrentino V, Giorgi M, Geremia B, Besmer P, Rossi P, Manova K, et al. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Oncogene* 1991;6:149-51.
30. Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, et al. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1998;125:4585-93.
31. Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005;11:156-63.
32. Brewer L, Corzett M, Balhorn R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 2002;277:38895-900.
33. Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978;117:347-56.
34. Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003;278:29471-7.
35. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;460:473-8.
36. Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2009;16:37-47.
37. McIver SC, Roman SD, Nixon B, McLaughlin EA. miRNA and mammalian male germ cells. *Hum Reprod Update* 2012;18:44-59.
38. Ro S, Park C, Sanders KM, McCarrey JR, Yan W. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev Biol* 2007;311:592-602.
39. Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction* 2007;134:73-9.
40. Marcon E, Babak T, Chua G, Hughes T, Moens PB. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res* 2008;16:243-60.
41. Amanai M, Brahmajoyula M, Perry AC. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol Reprod* 2006;75:877-84.
42. Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl* 2005;26:70-4.
43. Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011;26:3401-12.
44. O'Donnell KA, Boeke JD. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* 2007;129:37-44.
45. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001;28:82-6.
46. Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998;4:939-45.
47. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988;44:52-5.
48. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006;27:890-8.
49. Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, et al. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008;23:11-6.
50. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. A novel mechanism of protamine expression de-regulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod* 2006;12:41-50.
51. Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45(Suppl 1):S109-13.
52. Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008;104:1570-9.
53. Garrido N, Martinez-Conejero JA, Jauregui J, Horcajadas JA, Simon C, Remohi J, et al. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril* 2009;91:1307-10.
54. Garcia-Herrero S, Meseguer M, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 2009;94:1360-73.
55. Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;22:25-36.
56. Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2011. Epub October 12, 2011.